

茨城県におけるヒタチノスナジホコリタケ（担子菌門，ハラタケ科）の追加記録およびその系統的位置

糟谷大河*・宇野邦彦**・保坂健太郎**

(2013年9月26日受理)

Additional Records of *Lycoperdon ericaeum* (Basidiomycota, Agaricaceae) from Ibaraki Prefecture, Japan, with Notes on Its Phylogenetic Placement

Taiga KASUYA*, Kunihiro UNO** and Kentaro HOSAKA**

(Accepted September 26, 2013)

Abstract

A lycoperdaceous fungus, *Lycoperdon ericaeum* was collected in a coastal pine forest of Hitachinaka, Ibaraki Prefecture, Japan. This is the second report of *L. ericaeum* in Japan. To reveal the phylogenetic position of Japanese specimens of *L. ericaeum*, molecular phylogenetic analyses of the present fungus were conducted. By maximum parsimony analyses of nuclear rRNA ITS region, materials of *L. ericaeum* collected from Japan (Ibaraki) and Europe (Sweden) were placed within the same well-supported clade. The present analyses revealed that Japanese and European specimens of *L. ericaeum* are monophyletic, identical taxon.

Key words: Ibaraki Prefecture, lycoperdaceous fungus, *Lycoperdon ericaeum*, molecular phylogeny, taxonomy.

はじめに

担子菌門ハラタケ科ホコリタケ属に属するきのこの一種、ヒタチノスナジホコリタケ *Lycoperdon ericaeum* Bonord. はヨーロッパ、北アメリカおよび日本に分布する(糟谷, 2011)。日本においては、茨城県那珂郡東海村および稲敷市の針葉樹林内の砂地上で採集され、糟谷(2011)が日本新産種として報告したが、それ以降の報告例はない。筆者らは、茨城県ひたちなか

市内の海岸砂地の針葉樹林内において、新たにヒタチノスナジホコリタケの子実体発生を確認したのでここに報告する。

ところで、ヒタチノスナジホコリタケを含むホコリタケ属菌については、これまでに詳細な分子系統学的研究が行われている(Larsson and Jeppson, 2008; Jeppson *et al.*, 2012)。ホコリタケ属内におけるヒタチノスナジホコリタケの系統的位置もすでに明らかとなっているが(Larsson and Jeppson, 2008)、日本産標本

*千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科 〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3番地 (Department of Environmental System Science, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 3 Shiomi-cho, Choshi, Chiba 288-0025, Japan).

**国立科学博物館植物研究部 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1 (National Museum of Nature and Science, 4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan).

を用いた分子系統解析は行われておらず、日本産標本の系統的位置は明確になっていなかった。そこで筆者らは、今回採集したヒタチノスナジホコリタケの標本を用いて分子系統解析を試みた。本報告ではその系統的位 置についても考察する。

材料および方法

1. 子実体の採集および標本作製

筆者の一人、糟谷は2011年10月21日および同年11月6日に、茨城県ひたちなか市馬渡、国営ひたち海浜公園内のアカマツ *Pinus densiflora* Siebold et Zucc. およびクロマツ *Pinus thunbergii* Parl. からなる針葉樹林内 (図 1A) において、複数のホコリタケ型きのこ

類の子実体を発見した (図 1B-D)。採集した子実体は写真撮影の後、肉眼的特徴を記録した。これらの形態的特徴は、糟谷 (2011) による記載とよく一致していたことから、筆者らはこれらをヒタチノスナジホコリタケと同定した。

子実体は、食品用乾燥機 (Snackmaster Express FD-61, Nesco/American Harvest, WI, USA) を用いて 46°C で 36 時間熱乾燥させ、乾燥標本を作製した。乾燥標本に加えて、Hosaka and Castellano (2008), Hosaka *et al.* (2010), Kasuya *et al.* (2012) の方法に従い、新鮮な子実体から剃刀の刃を用いてグレバ (基本体) の一部を切り取り、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 0.1 M 亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) を添加した DMSO バッファー (Seutin *et al.*, 1991) 中に浸漬し、4°C で保

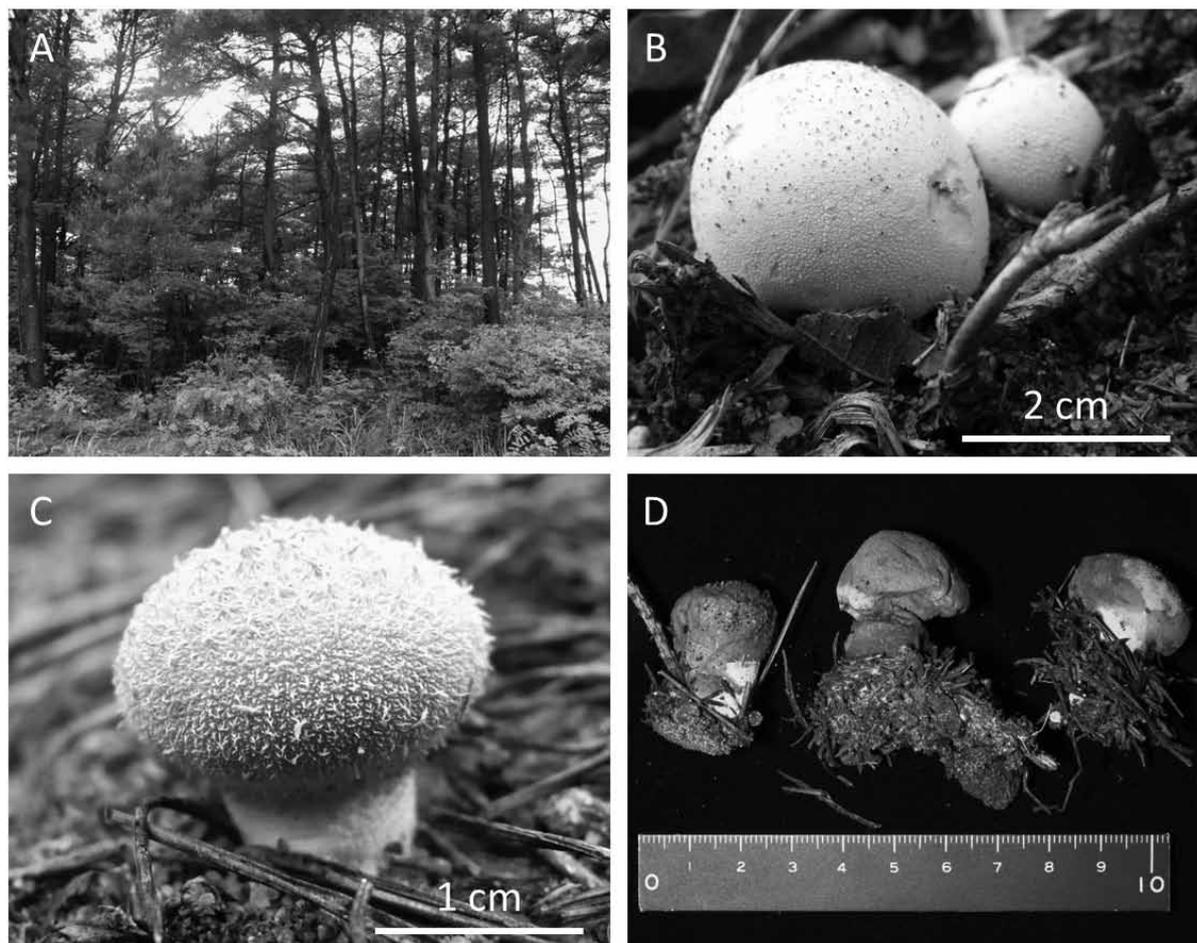


図 1. ヒタチノスナジホコリタケの発生環境および子実体。A: 発生環境。B: 剥落しやすい顆粒状突起からなる外皮に覆われた、未熟な子実体 (INM-2-71749)。C: 円錐形で先端部が癒合した外皮に覆われる、成熟した子実体 (INM-2-71760)。D: 帯黄色の内皮に覆われる、成熟した子実体 (INM-2-71760)。

Fig. 1. Habitat and basidiomata of *Lycoperdon ericaeum*. A: Habitat of *L. ericaeum*. B: Immature basidiomata showing exoperidium with pulverulent granules (INM-2-71749). C: A mature basidioma showing exoperidium with conical, convergent spines (INM-2-71760). D: Mature basidiomata showing yellowish endoperidium (INM-2-71760).

表 1. 本研究により新たに得られた核 rRNA ITS 領域の塩基配列情報およびそれらの GenBank 登録番号.

Table 1. Sequence data of the nuclear rRNA ITS region newly generated for the present study and associated GenBank accession numbers.

Species	Locality	Date	Collector	Herbarium	Specimen No.	Accession No.
<i>Lycoperdon ericaeum</i>	Japan, Ibaraki, Hitachinaka, Hitachi-kaihin Park	October 21, 2011	T. Kasuya	INM	2-71749	KF551245
<i>Lycoperdon ericaeum</i>	Japan, Ibaraki, Hitachinaka, Hitachi-kaihin Park	November 6, 2011	T. Kasuya	INM	2-71760	KF551246
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Japan, Ibaraki, Tokai, Ishigami-uchijuku	October 7, 2012	T. Kasuya	TNS	Kasuya B723	KF551247
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Japan, Ishikawa, Suzu, Mt. Horyu	October 20, 2012	T. Kasuya	TNS	Kasuya B780	KF551249
<i>Calvatia craniiformis</i>	Japan, Ibaraki, Tokai, Ishigami-uchijuku	October 7, 2012	T. Kasuya	TNS	Kasuya B734	KF551248
<i>Morganella subincarnata</i>	Japan, Ibaraki, Naka, To	October 2, 2011	K. Iguchi	INM	2-71757	KF551244
<i>Lepiota clypeolaria</i>	Japan, Yamanashi, Narusawa, Mt. Fuji	September 3, 2011	T. Kasuya	TNS	Kasuya B256	KF551250
<i>Macrolepiota neomastoidea</i>	Japan, Ibaraki, Tokai, Ishigami-uchijuku	October 2, 2011	N. Tsuda	INM	2-71756	KF551251

存した。なお、供試標本はミュージアムパーク茨城県自然博物館 (INM) に保管した (表 1)。

供試標本：茨城県ひたちなか市馬渡、国営ひたち海浜公園、海岸の針葉樹林内砂地上、2011 年 10 月 21 日、糟谷大河採集、INM-2-71749; 同所、2011 年 11 月 6 日、糟谷大河採集、INM-2-71760。

2. 子実体の形態観察

子実体の肉眼的特徴は、新鮮な生の子実体に基づき観察した。光学顕微鏡観察には、基本体の切片を作成し、それらを水、3% (w/v) KOH 水溶液、または 1% ラクトフェノール・コットンブルー溶液を用いて観察した。担子胞子の大きさは光学顕微鏡の 1,000 倍の倍率下で無作為に抽出した 40 個を用いて測定した。

3. DNA 抽出, PCR およびシーケンシング

採集した子実体からの DNA 抽出は、DMSO バッファー中に浸漬した試料を用いて行った。また、比較のためにミュージアムパーク茨城県自然博物館 (INM) および国立科学博物館 (TNS) に収蔵されている、茨城・石川両県産のヒタチノスナジホコリタケ以外のホコリタケ型きのご類の標本 (表 1) から DNA 抽出を行った。DNA 抽出は、ガラスミルクを用いた改変 CTAB 抽出法 (Hosaka, 2009; Hosaka and Castellano, 2008; 糟谷ほか, 2013) によった。すなわち、試料を乳鉢に入れた後、液体窒素を加えながら乳棒を用いて攪拌し、CTAB バッファーを加えた。その後、65°C で 1 時間加温し、たんぱく質を除去するため、クロロホルムとイソアミルアルコールの 24: 1 の混合液を加えた。試料にはさらに、6 M ヨウ化ナトリウムバッファー (Hosaka and Castellano, 2008) を加えて DNA を抽出した後、ガラスミルクを添加して DNA を吸着させ、エタノール/バッファー溶液で洗浄した。抽出した

DNA は 100 μ l の TE バッファー中で保存した。

以上により得られた DNA を鋳型とし、PCR により核 rRNA 遺伝子の転写領域内部スペース (ITS) 領域を増幅した。ITS 領域の増幅には ITS1f と ITS4 (Gardes and Bruns, 1993) のプライマーセットをそれぞれ用いた。PCR は、反応液を 20 μ l [1 μ l の精製 DNA, 1 μ l の dNTP (4 mM), 1 μ l の各プライマー (8 μ M), 0.5 units の Taq ポリメラーゼ (Takara), 2 μ l の MgCl₂ (25 mM), 2 μ l の Bovine Serum Albumin (BSA)] とし、以下の温度プログラムにより行った：前処理、94°C 3 分を 1 サイクル；熱変性、94°C 35 秒、アニーリング、51°C 30 秒、伸長、72°C 1 分を 30 サイクル；後処理、72°C 10 分を 1 サイクル。

PCR 産物は 1% アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドにより染色させ、紫外線照射により可視化させた。これにより遺伝子の増幅が確認された場合、PCR 産物を illustra ExoStar (GE Healthcare, UK) を用いて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) により定法に従ってダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。以上により得られた 6 点のホコリタケ型きのご類の塩基配列を、国際的な遺伝情報データベースである GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録した (表 1)。

4. 系統解析

本研究により新たに得られた ITS 領域の塩基配列 (表 1) は ATGC Ver. 6 (GENETYX, 東京) でアセンブルした後、Muscle v.3.6 (Edgar, 2004a; 2004b) によりアライメントを行い、さらに BioEdit ver. 7.0.1 (Hall, 1999) を用いてその結果を目視で確認し、必要に応じて補正した。その後、GenBank 上に公開されている、ヨーロッパ産ヒタチノスナジホコリタケを

含む43点のホコリタケ型きのご類の塩基配列(表2)を加えて系統解析を行った。このデータセットは前述の方法によりアライメントを行った後、PAUP* ver. 4.0b10 (Swofford, 2002) を用いて最節約法 [with the heuristic search option (TBR and MULTREES option on), and 1,000 replicates of random addition sequence] により系統樹を作成した。また、得られた系統樹のそれぞれのノードについて、ブートストラップ解析を行った [1,000 BS replicates using the heuristic search option (TBR and MULTREES options on), with 10 random addition

表 2. GenBank より入手し、系統解析に用いた核 rRNA ITS 領域の塩基配列情報。

Table 2. Sequence data used for the phylogenetic analysis of the nuclear rRNA ITS region obtained from GenBank.

	Species	Origin	Accession No.
<i>Arachnion</i>	<i>album</i>	USA	HQ235046
<i>Bovista</i>	<i>aestivalis</i>	USA	EU833650
<i>Bovista</i>	<i>dermoxantha</i>	USA	HQ235050
<i>Bovista</i>	<i>plumbea</i>	Pakistan	JX183694
<i>Calvatia</i>	<i>candida</i>	India	GU939632
<i>Calvatia</i>	<i>candida</i>	Sweden	DQ112624
<i>Calvatia</i>	<i>fenzlii</i>	China	FJ772413
<i>Calvatia</i>	<i>fragilis</i>	Germany	AJ617493
<i>Calvatia</i>	<i>gigantea</i>	China	HM237179
<i>Calvatia</i>	<i>pachydermica</i>	USA	EU833653
<i>Calvatia</i>	<i>turneri</i>	Sweden	DQ112596
<i>Disciseda</i>	<i>candida</i>	USA	EU833654
<i>Handkea</i>	<i>fumosa</i>	USA	EU833655
<i>Handkea</i>	<i>subcretacea</i>	USA	EU833658
<i>Handkea</i>	<i>utriformis</i>	China	JN411549
<i>Handkea</i>	<i>utriformis</i>	USA	EU833659
<i>Holocotylon</i>	<i>brandegeeanum</i>	USA	EU833660
<i>Lycoperdon</i>	<i>altimontanum</i>	Sweden	DQ112589
<i>Lycoperdon</i>	<i>caudatum</i>	Sweden	DQ112633
<i>Lycoperdon</i>	<i>echinatum</i>	Sweden	DQ112578
<i>Lycoperdon</i>	<i>ericacum</i>	Sweden	DQ112605
<i>Lycoperdon</i>	<i>ericacum</i>	Sweden	DQ112606
<i>Lycoperdon</i>	<i>foetidum</i>	Germany	AJ237623
<i>Lycoperdon</i>	<i>lambinonii</i>	Sweden	DQ112576
<i>Lycoperdon</i>	<i>marginatum</i>	USA	EU833661
<i>Lycoperdon</i>	<i>molle</i>	Sweden	DQ112566
<i>Lycoperdon</i>	<i>muscorum</i>	Sweden	JN572904
<i>Lycoperdon</i>	<i>norvegicum</i>	Sweden	DQ112631
<i>Lycoperdon</i>	<i>perlatum</i>	Germany	AJ237627
<i>Lycoperdon</i>	<i>perlatum</i>	Sweden	DQ112630
<i>Lycoperdon</i>	<i>perlatum</i>	USA	AY264919
<i>Lycoperdon</i>	<i>pulcherrimum</i>	USA	EU833663
<i>Lycoperdon</i>	<i>pusillum</i>	Japan	AB067724
<i>Lycoperdon</i>	<i>pyriforme</i>	USA	AJ237618
<i>Lycoperdon</i>	<i>pyriforme</i>	USA	AJ237619
<i>Lycoperdon</i>	<i>pyriforme</i>	USA	AJ237620
<i>Lycoperdon</i>	<i>pyriforme</i>	USA	AY854075
<i>Lycoperdon</i>	<i>rimulatum</i>	USA	EU833664
<i>Lycoperdon</i>	<i>umbrinum</i>	Sweden	DQ112593
<i>Morganella</i>	<i>subincarnata</i>	Germany	AJ237626
<i>Vascellum</i>	<i>curtisii</i>	USA	HQ235048
<i>Vacellum</i>	<i>intermedium</i>	USA	EU833667
<i>Vascellum</i>	<i>pratense</i>	Japan	AB067725

sequences]. なお、外群にはヒタチノスナジホコリタケと同様にハラタケ科に属するワタカラカサタケ *Lepiota chlypeolaria* (Bull.) P. Kumm. およびドクカラカサタケ *Macrolepiota neomastoidea* (Hongo) Hongo を用いた(表1)。

結果および考察

1. 種の記載

本種の子実体(図1B-D)は洋梨形~小頭形あるいは類球形となり、明瞭な無性基部を有し、高さ20-30 mm、基本体の直径は15-25 mm、無性基部の直径は15-25 mm。子実体の上部を構成する外皮の刺状突起は脆く、白色あるいはクリーム色~灰白色を帯び、微細な円錐形で、先端部が周辺の突起の先端部と癒合して星形をなし、もろく剥落しやすい(図1C)。子実体の下部では、外皮は微細な粉状~糠状の顆粒状突起からなる。時に、子実体の上部では刺状突起と顆粒状突起が混在する(図1B)。内皮は紙質で薄く、子実体が成熟すると黄褐色~淡褐色となる(図1D)。基本体の内部は幼時白色~クリーム色で密、やがて黄褐色の粘土状となり、成熟すると粉状で、オリーブ褐色の担子胞子が充満する。無性基部の内部は海綿状で密、幼時白色~クリーム色、成熟すると黄褐色となる。

弾糸は *Lycoperdon* 型、黄褐色~オリーブ褐色、直径4-8 μm 、厚壁、内部に隔壁を有し、隔壁部分で短く破断しやすく、叉状に分枝しながら細くなり、先端は尖る。弾糸表面には球形~類球形の小孔を多数有する。偽弾糸を欠く。担子胞子は球形~類球形、直径(3-)3.5-4.5 μm (突起を含まない)、厚壁、小柄を備えるか欠く。担子胞子表面は微細な突起が散在し、黄褐色~オリーブ褐色。

本報告は日本におけるヒタチノスナジホコリタケの2報目の記録であり、茨城県においては東海村、稲敷市に次いでひたちなか市にも分布することが明らかとなった。茨城県内では、本種の既知の発生環境はいずれも針葉樹林内の砂地上であり、本種は県内の同様の環境に広く分布している可能性がある。

2. 日本産ヒタチノスナジホコリタケの系統的位置

核 rRNA 遺伝子の ITS 領域を用いた系統解析に基づき、ヒタチノスナジホコリタケを中心としたホコリタケ型きのご類の系統樹を構築した結果、日本(茨城県)

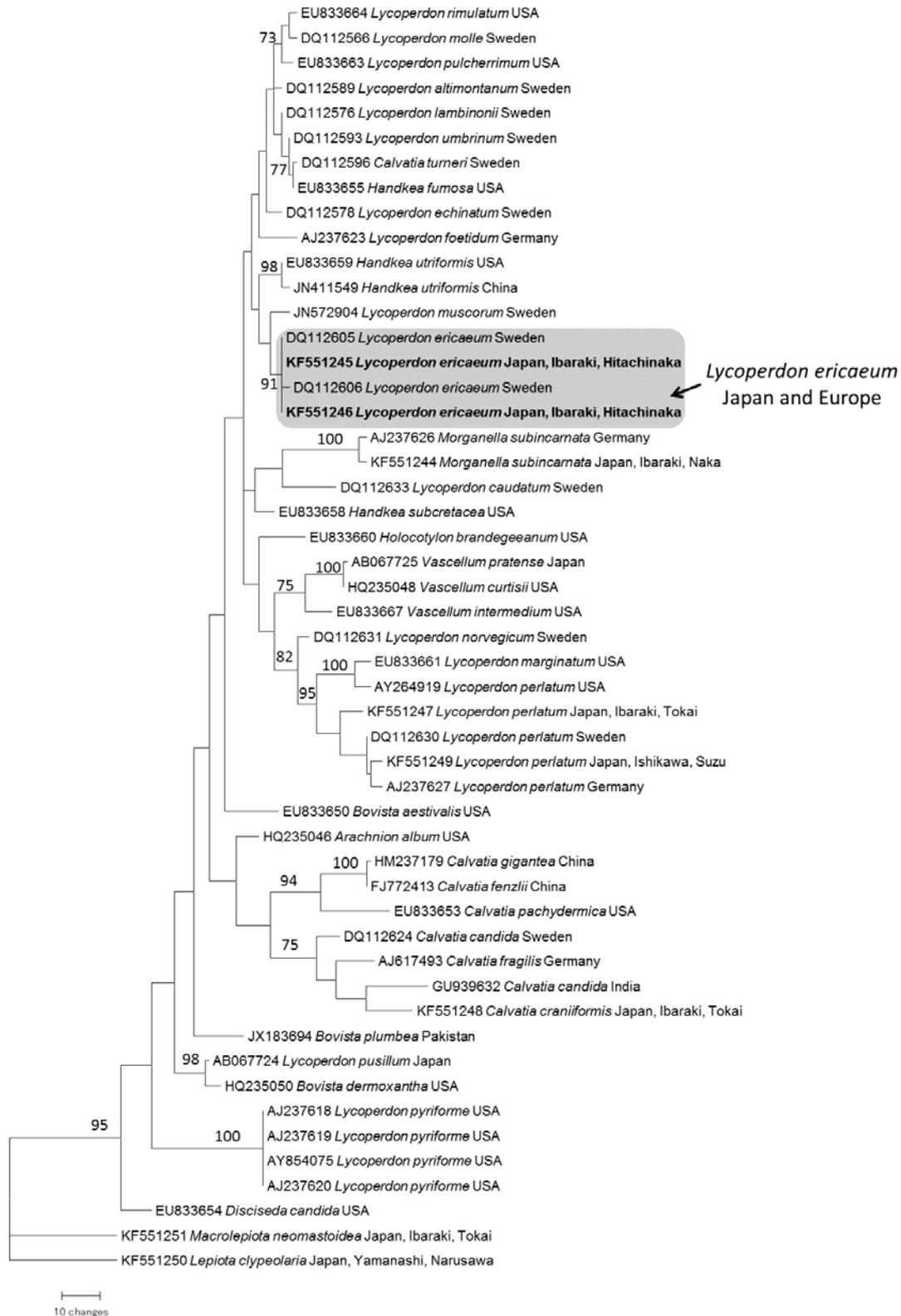


図2. ヒタチノスナジホコリタケの核 rRNA ITS 領域に基づく最節約法による系統樹。各枝上の数値は最節約法のブートストラップ値。

Fig. 2. One of 294 parsimonious trees of *Lycoperdon ericaeum* derived from maximum parsimony analysis based on the nuclear rRNA ITS region. Numbers along branches are nodal supports (parsimony bootstrap values).

およびヨーロッパ（スウェーデン）産のヒタチノスナジホコリタケは同一のクレードを形成し、単系統群をなした（図2）。また、このクレードは最節約法のブートストラップ値で高く支持された（図2）。このように、日本およびヨーロッパ産のヒタチノスナジホコリタケは単系統であり、クレード内での遺伝的差異もほとんどないことから、地理的な分化が進んでいないと考えられる。したがって、日本とヨーロッパ産のヒタチノスナジホコリタケは、形態的特徴および系統的位置から、分類学的に同一種として認識することが適切であると考えられる。

なお、Larsson and Jeppson（2008）は、ホコリタケ型きのこ類の系統樹において、ヒタチノスナジホコリタケが *L. muscorum* Morgan と姉妹群を形成することを示しているが、本研究の解析結果もそれを支持するものであった（図2）。Demoulin（1979）は、*L. muscorum* が形態的にヒタチノスナジホコリタケに近縁であるとして両者を同種と扱い、*L. muscorum* を *L. ericaeum* の異名とみなしている。しかし、*L. muscorum* は子実体が著しい円筒形で細長く伸ばした無性基部を有し、外皮が褐色を帯びる点、また弾糸表面の小孔がまれである点（Kreisel, 1962）など、形態的にヒタチノスナジホコリタケと識別できる。さらに、系統的にも *L. muscorum* はヒタチノスナジホコリタケと異なる（図2）ことから、両者は別種として扱うことが適当であると考えられる。

本研究の解析結果は、ヒタチノスナジホコリタケが日本とヨーロッパという、地理的に離れた地域に広く分布する種であることを示している。ホコリタケ型きのこ類の栄養獲得様式は腐生性であり（Larsson and Jeppson, 2008）、その分散に際しては特定の宿主の分布等による制限を受けにくいと考えられる。このため、ホコリタケ型きのこ類は広域に分布する種が多いと推測されているが（Larsson and Jeppson, 2008）、本研究からもこのことが示唆された。なお、ヒタチノスナジホコリタケは北アメリカにも分布するため（糟谷, 2011）、今後は北アメリカ産標本の系統的位置も検討する必要がある。

謝 辞

ひたち公園管理センター企画2課前課長の影山秀子氏には、国営ひたち海浜公園内での野外調査に際しご

協力頂いた。また、ミュージアムパーク茨城県自然博物館の鶴沢美穂子氏および今村 敬氏には、供試標本の保管に際してご協力いただいたほか、本稿をまとめるに際し有益なご助言を頂いた。以上の方々に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Demoulin, V. 1979. The typification of *Lycoperdon* described by Peck and Morgan. *Beih. Sydowia*, **8**: 139-151.
- Edgar, R. C. 2004a. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, **32**: 1,792-1,797.
- Edgar, R. C. 2004b. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, **5**: 113.
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.*, **2**: 113-118.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.*, **41**: 95-98.
- Hosaka, K. 2009. Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, **35**: 151-167.
- Hosaka, K and M. A. Castellano. 2008. Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, **34**: 161-173.
- Hosaka, K., T. Kasuya, H. T. Reynolds and G. H. Sung. 2010. A new record of *Elaphomyces guangdongensis* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Fungi) from Taiwan. *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, **36**: 107-115.
- Jeppson, M., E. Larsson and M. P. Martin. 2012. *Lycoperdon rupicola* and *L. subumbrinum*: two new puffballs from Europe. *Mycol. Progress*, **11**: 887-897.
- 糟谷大河. 2011. 日本産ホコリタケ科知見. 6. 茨城県から採集された日本新産種 *Lycoperdon ericaeum*. 日本菌学会会報, **52**: 49-53.
- Kasuya, T., K. Hosaka, K. Uno and M. Kakishima. 2012. Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. *Mycoscience*, **53**: 411-426.
- 糟谷大河・都野展子・橋屋 誠・黒川悦子・宇野邦彦・保坂健太郎. 2013. 石川県小松市においてナガエノスギタケの発生により確認されたコウベモグラの営巣例、および日本産ナガエノスギタケの系統的位置に関する知見. 小松市立博物館研究紀要, **47**: 23-34.
- Kreisel, H. 1962. Die Lycoperdaceae der Deutschen Demokratischen Republik. *Feddes Repert.*, **64**: 89-201.
- Larsson, E. and M. Jeppson. 2008. Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycol. Res.*, **112**: 4-22.
- Seutin, G., B. N. White and P. T. Boag. 1991. Preservation of

- avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.*, **69**: 82-90.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP * : phylogenetic analysis using parsimony and other methods (*PAUP version 4.0 beta 10). Sinauer, Sunderland.

(要 旨)

糟谷大河・宇野邦彦・保坂健太郎. 茨城県におけるヒタチノスナジホコリタケ (担子菌門, ハラタケ科) の追加記録およびその系統的位置. 茨城県自然博物館研究報告 第16号 (2013) pp. 43-49.

茨城県ひたちなか市の針葉樹林内砂地上において, ヒタチノスナジホコリタケ *Lycoperdon ericaeum* が採集された. これは本種の日本における2報目の記録である. 日本産ヒタチノスナジホコリタケの系統的位置を明らかにするため, 核 rRNA 遺伝子の ITS 領域に基づき分子系統解析を行った結果, 日本産標本はヨーロッパ産のヒタチノスナジホコリタケと同一のクレードに位置した. このクレードは最節約法のブートストラップ値でも高く支持された. 今回の解析から, 日本とヨーロッパ産のヒタチノスナジホコリタケは, 系統的にも同一の分類群であることが明らかとなった.

(キーワード): 茨城県, ホコリタケ型きのこ類, ヒタチノスナジホコリタケ, 分子系統解析, 分類学.